



저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이 학 석 사 학 위 논 문

Lymphocystis disease virus (LCDV)의
major capsid protein (MCP) 유전자를
발현하는 재조합 viral hemorrhagic
septicemia virus (VHSV)

제작 및 그 특성

2012년 08월

부 경 대 학 교 대 학 원
수 산 생 명 의 학 과

김 선 영

이 학 석 사 학 위 논 문

Lymphocystis disease virus (LCDV)의
major capsid protein (MCP) 유전자를
발현하는 재조합 viral hemorrhagic
septicemia virus (VHSV)

제작 및 그 특성

지도교수 김 기 홍

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

2012년 08월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 명 의 학 과

김 선 영

김선영의 이학석사 학위논문을 인준함

2012 년 08 월 24 일



목 차

Abstract

I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	5
1. 세포 및 바이러스	5
2. T7 RNA polymerase (T7 RNAP) 발현 EPC cell line 구축	6
2-1. Retroviral vector 제작 및 EPC cell transfection	6
2-2. Plasmid vector 제작 및 EPC cell transfection	7
3. LCDV의 MCP를 발현하는 재조합 VHSV 발현 벡터 제작	7
4. N, P, L 단백질을 만드는 supporting plasmid 제작	8
5. LCDV의 MCP를 발현하는 재조합 VHSV 제작 및 확인	9
5-1. LCDV의 MCP를 발현하는 재조합 VHSV 제작	9
5-2. 재조합 VHSV 제작 확인	9
6. 재조합 VHSV의 replication 확인	10

7. 세포에 따른 재조합 VHSV의 감염성 비교	11
8. Semi-quantitative RT-PCR을 이용한 Mx gene 발현 확인	11
8-1. Luciferase reporter system을 이용한 Mx 유전자 발현 확인	12
8-2. in vivo 상에서 Mx 유전자 발현 확인	12
III. 결 과	16
1. LCDV의 MCP를 발현하는 재조합 VHSV 생산	16
1-1. HINAE cell 에서의 LCDV 감염 및 증식 여부 확인	16
1-2. LCDV의 MCP를 발현하는 재조합 VHSV 생산 및 확인	19
2. 성장 곡선을 통한 재조합 VHSV의 replication 확인	24
3. 세포별 재조합 VHSV 감염성 비교 확인	25
4. In vitro, In vivo 상에서 Mx 유전자 발현 확인	27
4-1. Luciferase reporter system을 이용한 Mx 유전자 발현 확인	27
4-2. In vivo 상에서 Mx 유전자 발현 확인	29
IV. 고 찰	31
V. 요 약	35

VI. 감사의 글	37
VII. 참고문헌	39

Production and characterization of recombinant viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) expressing major capsid protein (MCP) gene of lymphocystis disease virus (LCDV).

Seonyoung Kim

Department of fish pathology, The Graduate School,
Pukyong National University

Abstract

Viral diseases caused by viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) and lymphocystis disease virus (LCDV) have seriously damaged on the aquaculture of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). VHSV infections can lead to mass mortality of olive flounder at low temperature periods and LCDV disease reduces salability of fish by outstanding nodular lesions. However, there has been no effective control measure against these viral diseases yet. Recently, recombinant viruses generated through reverse genetics system have been used to uncover functions of viral genes and to develop attenuated live vaccines. Previously, a recombinant VHSV (rVHSV- Δ NV-EGFP) having the green fluorescent protein (GFP) gene instead of the NV gene had been produced using the reverse-genetics method and the high vaccine potential of the recombinant VHSV as a live attenuated vaccine was confirmed by in vivo immunization experiments. In this study, another recombinant VHSV (rVHSV- Δ NV-

MCP) containing the major capsid protein (MCP) gene of LCDV instead of the NV gene was rescued by reverse genetics technology and basic characteristics of the recombinant virus were analyzed for further use as a dual vaccine against VHSV and LCDV. *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) cells expressing T7 RNA polymerase was transfected with a mixture of pVHSV- Δ NV-MCP, pCMV-N, pCMV-L, pCMV-P. Generation of rVHSV- Δ NV-MCP was confirmed by RT-PCR and rescue of infectious rVHSV- Δ NV-MCP was confirmed by observation of plaque formation. Replication efficiency of rVHSV- Δ NV-MCP was distinctly lower than that of wild-type VHSV. The cytopathic effect (CPE) induced by infection of EPC cells, hiram natural embryo (HINAE) cells or Chinook salmon embryo (CHSE-214) cells with wild-type VHSV or rVHSV- Δ NV-MCP at MOI 0.1, MOI 0.001, or MOI 0.00001 after 7 days post-infection was observed. EPC cells and HINAE cells were more sensitive than CHSE-214 cells, indicating differences in viral susceptibility according to cell types. To determine type I interferon response of hosts, expression of Mx gene in EPC cells and in olive flounder in response to infection with wild-type VHSV or rVHSV- Δ NV-MCP was investigated using luciferase reporter system and semi-quantitative RT-PCR, respectively. The highest increase of luciferase activity was detected from supernatant of cell infected with rVHSV- Δ NV-MCP at MOI 1.0. In vivo experiment, the Mx gene expression in olive flounder injected with rVHSV- Δ NV-MCP was higher than fish injected with wild-type VHSV. These results suggest that the present rVHSV- Δ NV-MCP possesses characteristics that are needed to be used as live attenuated vaccines. Further in vivo vaccine studies are needed to apply the rVHSV- Δ NV-MCP to a combined vaccine against VHSV and LCDV infections in olive flounder.

I. 서론

세계적으로 증가하고 있는 수산물의 수요로 인해 이를 충족시키기 위한 양식 산업이 중요시 되고 있다. 양적 양식 생산의 팽창과 함께 양식 환경조건은 악화되었고 많은 질병원이 출현하게 되어 만연하는 질병으로 인해 양식업은 어류의 질병 폐사로 막대한 손실을 겪고 있다. 현장에서 항생제 등 약물을 이용한 질병제어가 시도되고 있으나 항생제의 남용으로 인해 양식 어류에서 내성균이 출현하는 등 항생제 치료 효과가 점차 악화되고 있는 실정이다. 이에 질병의 출현 이후에 치료를 위한 전략보다는 질병을 예방할 수 있는 전략이 매우 중요시 되고 있다. 단순한 양식 환경의 관리만으로는 원인균에 대한 직접적인 방어 효과를 기대하기 힘들기 때문에 백신 전략을 이용한 양식 어류의 질병제어가 점차 중요시되고 있다. 양식 넙치에서 발생하는 바이러스성 질병 중 viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV)와 lymphocystis disease virus (LCDV)는 심각한 피해를 주는 주요 질병으로 아직 효과적인 대책은 개발되지 않았다. 본 연구에서는 이 두 바이러스에 대한 복합 백신을 제작하고, 그 특성을 알아보고자 한다.

Viral hemorrhagic septicemia disease (VHSD)를 야기하는 viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV)는 양식어류는 물론 야생어류의 대량 폐사를 일으키는 주요 원인 중 하나로 알려져 있으며 저수온기에 넙치 치어뿐 아니라 성어에서도 높은 폐사를 일으킨다(Schlottfeldt & Ahne, 1988; Schlottfeldt et al. 1991; Mortensen et al., 1999; Isshiki et al., 2003; Skall et al., 2005). VHSV 는 family Rhabdoviridae, genus *Novirhabdovirus* 에 속하는 바이러스로 IHNV 와 HIRRV 와 같은 분류학적 위치에 있으며, 크기는 180x70nm 정도이고 탄환형으로 외막을 가지는 negative-sense, single-stranded RNA 바이러스이다. VHSV 는 11-12Kb 의 nucleotide 로 이루어져 있으며, 이는 4 개의 구조단백질과 하나의 virion-associated polymerase 및 감염 세포에서만 발현 되는 non-virion protein 으로 이루어져 있다(Lenoir & de Kinkelin, 1975; de Kinkelin et al., 1980; Benmansour et al., 1994; Walker et al., 2000; Tordo et al., 2005) 다른 *Novirhabdovirus* 의 genome 과 같이 nucleoprotein (N), polymerase-associated phosphoprotein (P),

matrix protein (M), glycoprotein (G), RNA-dependent RNA polymerase (L)과 non-virion protein (NV) 로 구성되어 있다. Non-virion protein 인 NV 유전자는 *Novirabdomavirus* 의 특징으로 G 유전자와 L 유전자 사이에 있으며, genome 들은 3' -N-P-M-G-NV-L-5' 의 순서로 배열되어 있다(Schutze et al., 1996, 1999; Estepa et al., 1999; Tordo et al., 2005).

Lymphocystis disease (LCD)를 일으키는 lymphocystis disease virus (LCDV)는 family Iridoviridae, genus *Lymphocystivirus* 에 속하며, double-stranded DNA 바이러스로 직경이 200 ± 50 nm이며 20 면체이다. 전 세계적으로 140 여종의 연골어류에 광범위하게 감염 되는 것으로 보고되어 있다(Brown, 1986; Heppell & Berthiaume, 1992; Chinchat et al., 2005). LCDV 에 감염되면 대량폐사는 나타나지 않지만, 체표에 나타나는 병변으로 인해 상품가치가 하락하게 되고 다른 병원체에 감염될 가능성이 높고 빈혈이 나타나기도 하며 성장률이 감소한다(Iwamoto et al., 2002). LCDV 에 감염된 어류는 몸 표면에 가시적인 결절성 병변을 나타내는데, 이는 바이러스의 빠른 복제와 이로 인한 숙주의 후속적인 유사분열 억제로 인해 나타난다. 체표에 나타나는 결절성 병변은 흔히 lymphocystis cell (LC)이라고 불리는데, 이렇게 비정상적으로 발달한 세포(hypertrophied cells)는 피부와 지느러미, 입 주위에 주로 존재한다(Samalecos, 1986). 우리나라에서는 가장 많이 양식되고 있는 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)에 주로 감염이 되는 것으로 보고가 되어 있고 경제적으로 많은 피해를 준다(Do et al., 2005; Kitamura et al., 2006a). Iridoviridae 에 속하는 바이러스의 큰 특징인 50kDa 정도의 major capsid protein (MCP)은 바이러스의 감염을 일으키는 주된 polypeptide 이고, virion protein 의 약 45%를 구성한다(Flugel et al., 1982; Robin et al., 1986). MCP 는 항원성이 높으며, 이에 대한 항체들이 바이러스를 진단을 하기 위해 시중에 판매되고 있다. 어류에서도 재조합 MCP 를 제작하여 혈청학적인 진단을 위한 연구나 백신으로서의 가능성이 연구되기도 하였다(Seo et al., 2008).

지난 수십 년 동안 어류의 감염성 바이러스성 질병을 예방하기 위하여 불활성화 백신, 약독화 백신, 재조합 단백질 백신 및 DNA 백신 등이 사용되어 왔다(Gomez-Casado E., 2011). 이 중, 바이러스 약독화 백신은 cell line 을 이용하여 대량으로 생산이 가능하고 세포성 면역과 체액성 면역 모두를 유도하여

높은 예방효과를 얻을 수 있다는 장점이 있어 효과적인 백신으로 사용 할 수 있다. 하지만 이는 바이러스의 병원성이 다시 복원 될 수 있다는 큰 단점이 있다. 이러한 단점을 보완하기 위해 최근 reverse genetics 를 이용한 안전하고 새로운 바이러스 백신이 연구되고 있다. Reverse genetics system 은 바이러스의 genome 과 상보적인 cDNA 를 이용하여 바이러스를 cell line 에서 다시 생성해 내는 방법이다. 즉, T7 RNA polymerase (T7RNAP)가 발현되고 있는 세포에 바이러스의 full genome 을 encoding 할 수 있는 plasmid 를 transfection 하는 것이다. 이때 바이러스를 encoding 하는 cDNA 의 3' 말단에는 hepatitis delta virus (HDV) ribozyme sequence 를 넣어줘서 스스로 3' 말단을 정밀하게 잘라낼 수 있도록 해 준다. 이러한 reverse genetics system 은 바이러스 유전자 중 아직 기능이 알려지지 않은 바이러스의 유전자를 knock-out 하여 기능을 분석 할 수도 있고 작동 기작을 알 수 있으며, 바이러스 genome 상의 특정 유전자를 knock-out 시키거나 mutation 시켜 약독화된 재조합 생백신의 개발이 가능하다. 또, 다른 병원체의 항원 유전자를 삽입하여 발현시킴으로써 다양한 재조합 백신을 개발하여 복합 백신으로 응용 할 수 있는 특성을 가지고 있다(Schnell et al., 1994; Palese et al., 1996; Neumann & Kawaoka, 2001; Neumann et al., 2002; von Messling & Cattaneo, 2004). 이러한 재조합 바이러스는 다른 병원체의 항원 및 자신의 단백질을 감염된 숙주 세포 내에서 발현시키고 또한 새로이 형성된 viral progeny 는 처음의 감염세포에서 나와 다른 세포로 감염될 수 있기 때문에, MHC class I 을 통한 세포성 면역뿐만 아니라 MHC class II 를 통한 체액성 면역반응도 유도할 수 있는 능력이 있다. 또한 백신 투여경로에 있어서도 자연적인 감염경로를 통할 수 있다는 장점이 있다.

최근 본 연구실에서는 VHSV 의 NV 유전자가 knock-out 된 재조합 VHSV 를 제작하여 그 특성에 대해 연구를 하였으며, NV 유전자가 knock-out 된 재조합 VHSV 를 넓치에 면역화 실험하여 높은 방어력을 유도하는 것을 검증 한 바 있다(Kim et al., 2011; Kim & kim, 2011). 또, 같은 rhabdoviridae 에 속하는 hirame rhabdovirus (HIRRV)의 G 유전자를 NV 유전자가 knock-out 된 VHSV 에 삽입하여 이를 발현하는 재조합 VHSV 를 제작하여, 재조합 VHSV 를 넓치에 면역화 실험하여 HIRRV 와 VHSV 두 가지 모두에 대한 면역 효과도 확인하였다(Kim & Kim, 2011). 본 연구에서는 이러한 재조합 VHSV 를 이용하여 양식 넓치에서 문제가 되는 바이러스 질병의 원인 바이러스 중 하나인 LCDV 도

동시에 예방할 수 있는 복합백신을 제작하기 위해 NV 유전자가 knock-out 된 VHSV 에 lymphocystis disease virus (LCDV)의 major capsid protein (MCP) 유전자를 삽입한 벡터를 이용하여 LCDV 의 MCP 를 발현하는 재조합 VHSV 를 제작하였으며, 이를 복합백신으로 사용하기 위하여 그 특성을 알아보았다.

II. 재료 및 방법

1. 세포 및 바이러스

실험에 사용된 세포인 EPC(*Epithelioma papulosum cyprini*) cell, HINAE(*Hirame natural embryo*) cell은 penicillin (100U/ml), streptomycin (100µg/ml) 및 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco) 이 첨가된 Leibovitz medium (L-15, Sigma)를 이용하여 배양하였다.

실험에 사용한 바이러스인 VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus)는 2008년 VHS 질병이 발병한 경남 소재 넙치 양식장에서 병든 넙치로부터 분리한 VHSV KJ2008을 사용하였고, LCDV (lymphocystis disease virus)는 제주도 넙치 양식장의 lymphocystis disease에 걸린 넙치로부터 얻은 림포시스티스 세포 (Lymphocystis cell)에서 분리하여 사용하였다. 이들 바이러스는 각각 15℃와 20℃에서 2% FBS와 항생제가 첨가된 배지에서 배양한 EPC와 HINAE cell에 접종하였으며, 접종 후 광범위하게 cytopathic effect (CPE)가 나타났을 때 4℃에서 10분간 4000 g로 원심 분리 후 그 상층액을 -80℃에 보관하여 추후 실험에 사용하였다.

2. T7 RNA polymerase (T7 RNAP) 발현 EPC cell line 구축

재조합 VHSV의 promoter로 사용되는 T7 promoter가 효율적으로 작동하기 위해서는 T7 RNA polymerase가 발현되는 EPC cell line이 필요한데, 2가지 방법을 이용하여 T7 RNA polymerase가 발현되는 EPC cell line을 구축하였다. T7 RNA polymerase gene은 *E. coli* BL21 (DE3) 균주의 DNA로부터 PCR을 통해 얻었다.

2-1. Retroviral vector 제작 및 EPC cell transfection

T7 RNA polymerase gene을 가지고 있는 Retrovirus를 만들기 위해 Retroviral Gene Transfer and Expression kit (Clontech)를 사용하였다. packaging cell은 non-mammalian cell도 감염이 가능한 GP2-293 cell을 사용하였다. pLNHX vector의 MCS에 Bgl II - pCMV - HindIII - T7 RNA pol. - BamH I - Sal I - Xho I - Apa I - Xho I cassette를 ligation 하였다. 제작된 T7 RNA polymerase/pLNHX vector (5ng)와 pVSV-G vector (2.5ng)를 2일 동안 배양한 GP2-293 cell (1×10^6 cells/T25 flask)에 Fugene 6 transfection reagent (Roche)를 이용하여 transfection 하였다. 1일 후, 항생제가 첨가된 배지로 배지를 교환하고, 2일 뒤에 T7 RNA polymerase gene을 가지고 있는 retrovirus를 수집하였다. 0.45 μ m syringe filter한 virus를 EPC cell에 접종하였는데 이 때, infection 효율을 높이기 위해 polybrene (4 μ g/ml)을 첨가하였다. 접종 24시간 후에 10% FBS와 항생제가 첨가된 L-15 배지로 배지를 교환해 주었다. 2~3일 후부터는 G-418 (400 μ g/ml) 항생제가 첨가된 배지로 배지교환을 하면서 세포를 selection 해 주었다.

2-2. Plasmid vector 제작 및 EPC cell transfection

E. coli BL21 (DE3) 균주로부터 genomic DNA를 분리 한 후, HindIII가 있는 forward primer와 BamH I이 있는 reverse primer로 PCR하여 T7 RNA polymerase gene을 얻었다(Table 1). PCR 산물을 발현 벡터인 pcDNA 3.1(+) vector (Invitrogen)에 ligation 하였다. Exfection prep kit (Geneall)를 이용하여 T7 RNA polymerase를 포함한 plasmid vector를 다량 얻은 후, EPC cell ($1 \times$

10⁶ cells/T25 flask)에 Fugene 6 transfection reagent (Roche)를 이용하여 transfection 해 주었다. 1일 후에 10% FBS와 항생제가 첨가된 L-15 배지로 배지를 교환하였다. Transfection 3일 후부터 G-418 (400 µg/ml) 항생제가 첨가된 L-15 배지로 배지를 교환하면서 세포를 selection 하였다.

3. LCDV의 MCP를 발현하는 재조합 VHSV 발현 벡터 제작

우선 재조합 VHSV 발현 벡터에 삽입할 LCDV의 MCP ORF gene을 얻기 위해 LCDV에 감염된 넙치에서 분리한 LCDV 감염 세포를 파쇄 한 후, genomic DNA extraction kit (Bioneer)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. VHSV NV gene 대신에 LCDV MCP gene을 발현하는 재조합 VHSV를 제작하기 위해 LCDV MCP gene ORF에 해당하는 fragment를 추출한 DNA를 template로 하여 *Cla* I enzyme site를 가진 forward primer와 *Nar* I enzyme site를 가진 reverse primer를 이용하여 PCR 증폭하였다(Table 1). PCR은 총 20 µl의 반응액 내에 4 µl의 5×HiPi Plus PCR Premix (ElpisBiotech, Korea), 1 µl의 10⁻¹ 희석한 cDNA template 및 1 µl (10 pmol/µl)의 specific primer가 포함되어 있었다. Thermal cycling 조건은 95°C에서 3분간 1 cycle, 95°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 30초씩 30 cycle을 돌렸고, 최종적으로 72°C 7분간 신장반응을 시켰다. PCR 증폭산물은 pGEM T-easy 벡터 (Promega)에 subcloning 한 후 sequencing 분석하였다. 미리 제작되어 있던 NV gene이 제거된 mutant cDNA 벡터 (pVHSV-ΔNV-EGFP)를 *Cla*I과 *Nar*I으로 처리하여 EGFP gene을 제거하였으며, 그 자리에 LCDV MCP gene을 삽입하였고 그 벡터를 pVHSV-ΔNV-MCP 라 명명하였다.

4. N, P, L 단백질을 만드는 supporting plasmid 제작

재조합 VHSV가 만들어 지기 위해서는 VHSV의 full cDNA vector는 물론이고 VHSV의 N, P, L 단백질을 발현하는 supporting plasmid가 필요하다. Wild VHSV를 template로 하여 각각의 유전자에 맞는 primer를 사용하여 PCR 증폭하였다(Table 1). 증폭된 각각의 유전자들은 CMV promoter가 있는 pcDNA3.1(+) vector에 ligation 하였고, 이들을 각각 pCMV-N, pCMV-P, pCMV-L이라 명명하였다.

5. LCDV의 MCP를 발현하는 재조합 VHSV 제작 및 확인

5-1. LCDV의 MCP를 발현하는 재조합 VHSV 제작

T7 RNA polymerase를 발현하고 있는 EPC cell이 80% 정도 자랐을 때 앞에서 제작한 벡터 pVHSV- Δ NV-MCP (2 μ g)과 pCMV-N (0.5 μ g), pCMV-P (0.3 μ g) 및 pCMV-L (0.2 μ g)을 함께 Fugene 6 transfection reagent (Roche)를 이용해 co-transfection 시킨 후 28°C에서 12 시간 incubation 하고 이를 15°C 옮겨 배양하였다. 전반적인 CPE가 관찰되었을 때, rubber policeman을 이용해 세포를 긁어서 떨어뜨린 후 freeze-thawing을 2회 반복하고 4000 g에서 10분간 원심분리 하였고, 이때 얻은 상층액을 P0라 하였다. P0를 다시 15°C T₂₅ 플라스크에서 배양한 EPC cell에 접종하고 7-10일 후 상층액 (P1)을 모아서 분주 후 -80°C에 보관하였다.

5-2. 재조합 VHSV 제작 확인

제작된 재조합 VHSV는 RT-PCR을 통하여 확인하였다. 상층액 P1에서 RNAiso

plus reagent (Takara)를 이용하여 total RNA를 추출하였다. cDNA를 제작하기 위해 1 μ g의 total RNA를 0.5 μ l의 random hexamer (0.5 μ g/ml, Promega)와 80 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시키고 다시 42 $^{\circ}$ C에서 60분간 2 μ l의 2.5mM dNTP mix (TakaRa), 0.5 μ l의 M-MLV reverse transcriptase (Promega) 및 0.25 μ l의 RNase inhibitor (Promega)가 포함된 reaction mixture와 incubation 하였다. cDNA를 template로 하여 VHSV-N과 VHSV-P specific gene primer 및 EGFP primer, LCDV MCP primer를 이용하여 PCR 증폭하였다(Table 1). PCR cycling 조건은 95 $^{\circ}$ C에서 3분간 1 cycle, 95 $^{\circ}$ C에서 30초, 60 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 30초씩 30 cycle을 돌렸고, 최종적으로 72 $^{\circ}$ C 7분간 신장반응을 시켰다. 이를 1% agarose gel에 전기영동 하여 확인하였다. 또한 제작된 rVHSV- Δ NV-MCP의 titer를 알기 위해 plaque assay를 수행하였다. Virus stock을 10⁻⁵ 에서 10⁻⁷까지 단계 희석 후 EPC cell monolayer에 접종하였다. 15 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 incubation 후 바이러스를 제거하고 0.7% agarose와 10% FBS, 1% 항생제가 들어간 L-15배지를 세포 위에 얹었다. 7일 후 세포를 10% formalin으로 고정 후 세포 위에 얹은 배지를 제거하였고, 3% crystal violet으로 30분간 실온에서 염색하였다. 염색액을 버리고 증류수로 세포를 수세한 후 plaque-forming units (PFU)를 산출하였다.

6. 성장곡선을 이용한 재조합 VHSV의 replication 확인

Wild-type VHSV와 재조합 VHSV의 replication을 plaque assay를 통한 성장 곡선으로 비교 분석하였다. 6-well plate에 EPC cell을 28 $^{\circ}$ C에서 monolayer로 배양한 후, wild-type VHSV와 rVHSV- Δ NV-MCP를 각각 MOI 1.0으로 접종하였고, 이를 15 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. 바이러스 접종 후 1일, 3일, 5일, 7일째에 상층액을 모아서 각각 plaque assay를 실시하여 plaque-forming units (PFU)를 산출하였고, 이를 그래프로 나타내어 성장곡선을 제작하였다.

7. 세포에 따른 재조합 VHSV의 감염성 비교

재조합 VHSV의 감염성이 세포의 종류에 따라 달라지는지 확인하기 위하여 서로 다른 세 가지 세포에 MOI를 달리하여 바이러스를 접종하여 CPE가 나타나는 양상을 비교해 보았다. 세포는 *Epithelioma papulosum cyprinid* (EPC) cell, *Hirame natural embryo* (HINAE) cell, *Chinook salmon embryo* (CHSE-214) cell 세 가지를 사용하였다. 6-well plate에 각각의 세포를 1×10^6 cell씩 분주하여 EPC는 28°C, CHSE-214와 HINAE는 20°C에서 배양하였다. 세포가 90% 정도 자랐을 때, wild-type VHSV와 rVHSV- Δ NV-MCP를 MOI 0.1, 0.001, 0.00001로 접종하였다. 바이러스를 접종한 세포는 15°C에서 배양하였고, 바이러스 접종 7일 후 각 세포의 CPE가 나타나는 양상을 관찰하였다.

8. Semi-quantitative RT-PCR을 이용한 Mx gene 발현 확인

재조합 VHSV에 대한 숙주의 인터페론 반응을 알아보기 위하여 Mx 유전자의 발현을 확인하였다. Type I interferon 반응은 척추동물에서 바이러스 감염 시 이를 방어하기 위해 가장 먼저 일어나는 면역 반응이다. 대표적인 IFN 유도 항바이러스 단백질은 Mx 유전자이며, 본 실험에서는 wild-type VHSV와 재조합 VHSV를 감염시켰을 때 Mx 유전자의 발현여부를 luciferase activity 측정과 semi-quantitative RT-PCR을 이용하여 확인하였다.

8-1. Luciferase reporter system을 이용한 Mx gene 발현 확인

In vitro 상에서 재조합 바이러스에 의한 Mx gene 발현을 확인 하기 위해서 pOFMx-reporter 벡터를 가지고 있는 EPC 세포를 이용하여 luciferase를 측정하였다. pOFMx-reporter 벡터는 시중에 판매되고 있는 luciferase reporter vector의 promoter를 제거 후 낚치 Mx 유전자의 promoter를 삽입하여 제작하였으며, 이 벡터를 EPC 세포에 transfection 후 selection 하여 pOFMx-reporter/EPC 세포를

제작하였다. pOFMx-reporter/EPC 세포를 6 well plate에 1.5×10^6 cell씩 분주하여 28°C 에서 배양하였다. 세포가 monolayer로 자랐을 때, wild-type VHSV와 rVHSV- Δ NV-MCP를 MOI 1.0과 0.1로 접종하고 15°C 에서 배양하였다. 바이러스 접종 12 시간과 24시간, 48시간째에 각 세포에서 상층액 50 μ l 을 수집하여 Ready-To-Glow secreted luciferase reporter assay kit (Clontech)와 VICTOR 3 multilabel plate reader (PerkinElmer)를 이용하여 매뉴얼에 따라 luciferase 활성을 측정하였다.

8-2. In vivo 상에서 Mx gene 발현 확인

In vivo 상에서 Mx 유전자의 발현을 확인하기 위하여 넙치 치어에 마리당 10^5 PFU의 wild-type VHSV와 rVHSV- Δ NV-MCP를 근육주사 하였고, L-15 배지를 바이러스와 같은 양으로 주사하여 control로 하였다. 이때 사용한 넙치는 VHSV 감염이 없는 것을 확인한 후 사용하였고, 수온은 15°C 로 유지하였다. 바이러스 접종 후 24시간과 48시간째에 그룹당 3마리씩 신장과 비장을 분리하여 TRizol reagent (Invitrogen)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. cDNA를 제작하기 위해 GoScript Reverse Transcription System kit (Promega)를 사용하였다. 1 μ g의 total RNA를 1 μ l의 random primer (0.5 μ g/ml)와 70°C 에서 5분간 반응시키고 얼음에 5분간 두었다. 여기에 3.5 μ l의 $MgCl_2$, 1 μ l의 PCR nucleotide mix, 0.5 μ l의 RNase inhibitor와 1 μ l의 reverse transcriptase가 포함된 reaction mixture와 25°C 에서 5분, 42°C 에서 60분, 70°C 에서 15분간 incubation 하였다. 이렇게 합성된 cDNA를 template로 하여 넙치 Mx 유전자 specific primer로 PCR하여 증폭하였고, 넙치의 β -actin gene을 control로 하였으며(Table 1), PCR 조건은 95°C 에서 3분간 1 cycle, 95°C 에서 30초, 60°C 에서 30초, 72°C 에서 30초씩 24 cycle (Mx gene) 또는 25 cycle (β -actin)을 돌렸고, 최종적으로 72°C 7분간 신장반응을 시켰다. 증폭된 산물들을 1% agarose gel에 전기영동 하여 확인하였다.

Table 1. Primers used in this study

1-1. For construction of recombinant VHSV genome

Name of primer		Sequence (5' to 3')	Restriction enzyme
LCDV-MCP	F	ATCGAT ATGGTGACTTCTGTAGCGGG	<i>Cla I</i>
	R	GGG CGCC TAAAGTACAGGAAATCCCATTG	<i>Nar I</i>

(Bolded nucleotides indicate restriction enzyme sites)

1-2. For construction of supporting plasmids

Name of primer		Sequence (5' to 3')	Restriction enzyme
pCMV-N	F	GGATCC CGGCACTTAAGTAGCAAAAAGTTT	<i>BamHI</i>
	R	GCGGCC GC TCCTTTTCTATCTATATGAGTTATGAGA	<i>NotI</i>
pCMV-P	F	AAGCTT CGGCACGATTATAGGAATTTTC	<i>HindIII</i>
	R	GCGGCC GC CTTTCTTTCTATCTATACGATGTGTTGTG	<i>NotI</i>
pCMV-L	F1	AAGCTT TGGCACTTTTGTGTTGTAGTC	<i>HindIII</i>
	R1	GCGGCC GC ACTAGTGGGCCCTGGTCGTGTG	<i>SpeI, NotI</i>
	F2	ACTAGT TCCTTACTTCGGGACTCAGACCAAACC	<i>SpeI</i>
	R2	GCGGCC GC CTTTTTCATCTAGTTGAGGAACAAG	<i>NotI</i>

(Bolted nucleotides indicate restriction enzyme sites)

1-3. For construction of T7 RNA polymerase-expressing plasmids

Name of primer		Sequence (5' to 3')	Restriction enzyme
pCMV-T7	F	AAGCTT CGGCACGATTATAGGAATTTTC	<i>Hind</i> III
RNAP	R	GGATCCTT ACGCGAACGCGAAGTCCG	<i>Bam</i> HI
pLNHX-MCS	F	TCGAAGATCTAAGCTTGGATCCGTCGACCTCGAGGGGCCC	
	R	GATCGGGCCCTCGAGGTGACGGATCCAAGCTTAGATCT	

(Bolted nucleotides indicate restriction enzyme sites)

1-4. For detection of replication of recombinant VHSV or LCDV

Name of primer		Sequence (5' to 3')
VHSV-N	F	ATGGAAGGGGAATCCGTGCAGC
	R	TTAATCAGAGTCCCCTGGGTAGTCG
VHSV-p	F	ATGACTGATATTGAGATGAGTGAATCATTGG
	R	CTACTCCAACCTGTCCAACCTCCGCC
LCDV-MCP	F1	ATGACTTCTGTAGCGGGTTCAAG
	R1	GTCGTTTTTATTTTGAAAGATCAATAATTCA
	F2	ACGGGTATGATGGAATGATATTCTGGG
	R2	CTAAAGTACAGGAAATCCCATTG
EGFP	F	ACGGGTATGATGGAATGATATTCTGGG
	R	TTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC

1-5. For detection of expression of Mx gene

Name of primer		Sequence (5' to 3')
OF- β -actin	F	ACGGACAGGTCATCACCATTGGAA
	R	ACATGGTGGTTCTCCAGATAGCA
OF-Mx	F	AACAGCCCAAGGCAAGATTG
	R	AATGTCCAGCTCCTCCTTCA

Ⅲ. 결 과

1. LCDV의 MCP를 발현하는 재조합 VHSV 생산

1-1. HINAE cell 에서의 LCDV 감염 및 증식 여부 확인

넙치의 림포시스티스 세포로부터 분리한 LCDV virus stock을 HINAE 세포에 접종 후, 20℃에서 배양하여 cytopathic effect (CPE)가 나타나는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1). CPE가 나타난 cell의 상층액을 수집하여 genomic DNA를 분리한 후 LCDV의 MCP specific primer로 PCR 하였고, 전기영동 한 결과 633bp 의 MCP specific band 를 확인할 수 있었다(Fig. 2).

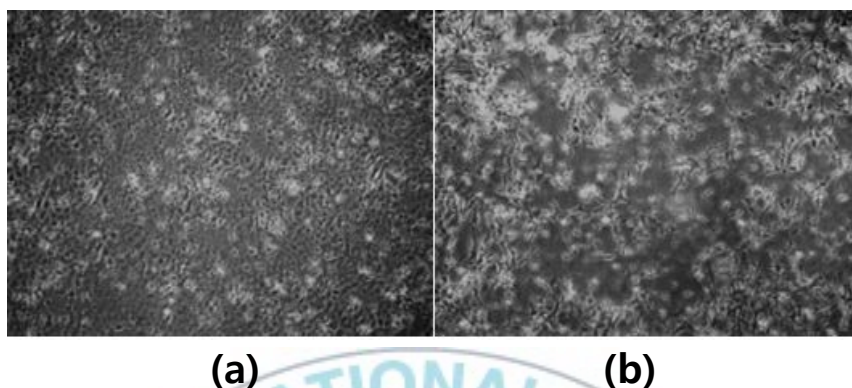


Figure 1. The cytopathic effect (CPE) induced by infection of HIRAME NATURAL EMBRYO (HINAE) cells with LCDV (b), but the control cells (a) showed no CPE.

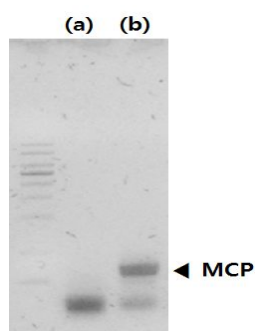


Figure 2. Confirmation of the infection of LCDV by RT-PCR. Viral genomic DNA extracted from stock supernatant of LCDV was amplified by PCR with specific LCDV MCP gene primers. PCR products were analyzed on a 1% agarose gel, and visualized with ethidium bromide (EtBr). In the HINAE cells infected with LCDV (b), the MCP gene was exactly amplified, whereas in the control HINAE cells (a), no band was amplified. The marker (M) is a 1kb DNA ladder (Bioneer, Korea).

1-2. LCDV의 MCP를 발현하는 재조합 VHSV 생산 및 확인

LCDV MCP gene을 발현하는 재조합 VHSV를 제작하기 위해 본 연구실에서 제작한 rVHSV- Δ NV-EGFP 벡터의 EGFP gene을 제한효소 (*Cla I*/*Nsi I*)를 이용하여 LCDV MCP gene으로 교체하여 mutant cDNA clone (pVHSV- Δ NV-MCP)을 제작하였다(Fig. 3). 이렇게 제작된 벡터와 supporting plasmid들을 미리 배양해 놓은 EPC cell에 co-transfection 시켜 며칠 후에 CPE가 나타나는 것을 관찰하였고(Fig. 4), 재조합 VHSV (rVHSV- Δ NV-MCP)를 얻을 수 있었다. 이렇게 얻은 재조합 VHSV (rVHSV- Δ NV-MCP)가 목적인대로 만들어졌는지를 확인하기 위해 CPE가 나타난 세포로부터 stock supernatant를 수집하여 이를 VHSV-N, VHSV-P detection primer와 MCP primer, EGFP primer를 이용하여 RT-PCR하였다. 그 결과 VHSV의 N 유전자 (약 1.2kb)와 P 유전자 (약 700bp), LCDV의 MCP 유전자 (약 1.8kb)가 정확하게 증폭이 된 것을 확인하였고, 기존의 pVHSV- Δ NV-EGFP에 있던 reporter EGFP gene은 증폭이 되지 않았음을 확인하였다(Fig. 5). 이로부터 재조합 VHSV가 목적인 대로 제작이 되었음을 확인하였다.

생산된 바이러스가 감염성이 있는 바이러스인지, 또 그 titer가 얼마나 되는지 알아보기 위해 plaque assay를 실시하여 plaque-forming units (PFU)를 산출하였

다. Plaque assay를 실시한 결과 9.73×10^7 PFU/ml로 나타났다(Fig. 6).

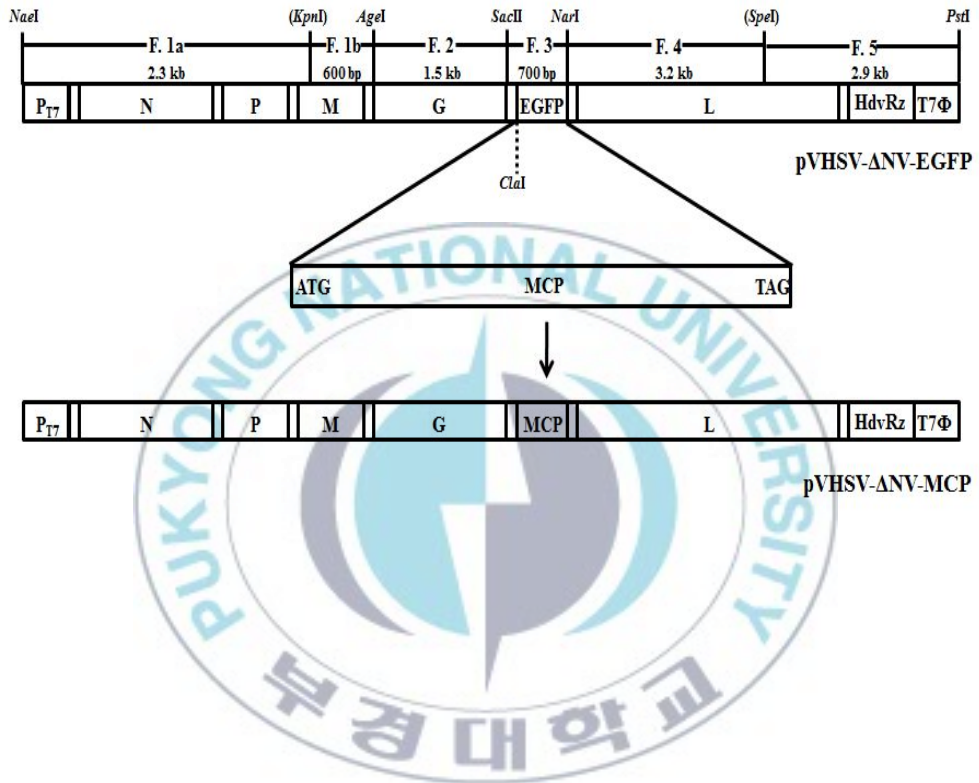


Figure 3. Construction of the mutated cDNA clones harboring LCDV MCP gene (pVHSV-ΔNV-MCP). The pVHSV-ΔNV-MCP was generated by replacement of the EGFP ORF in the pVHSV-ΔNV-EGFP with the LCDV MCP ORF using Cla I /Nar I restriction enzyme sites.

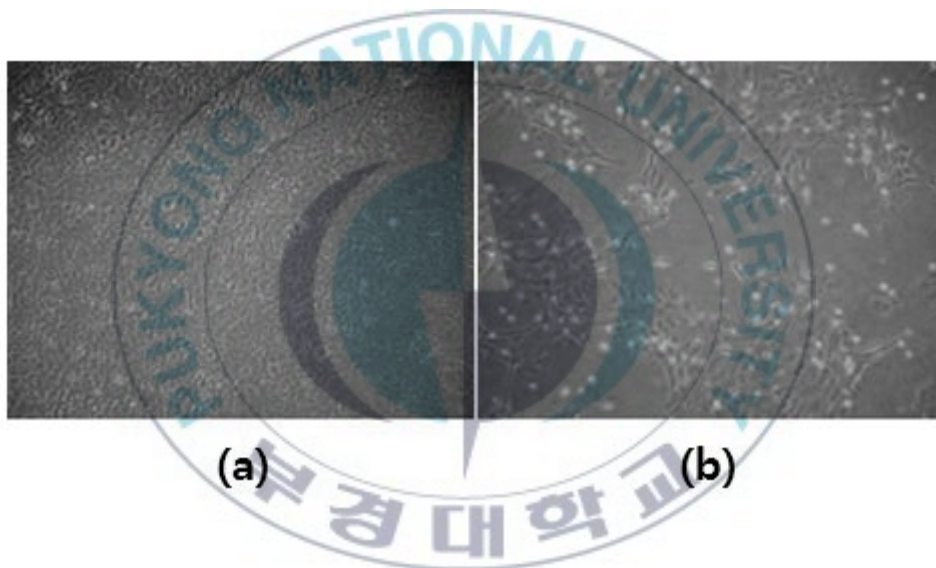


Figure 4. The cytopathic effect (CPE) induced by co-transfection of *Epithelioma papulosum cyprinid* (EPC) cells with plasmids expressing the N, P, L proteins and pVHSV- Δ NV-MCP (b). EPC cells transfected with the plasmids showed evident CPE, but the control cells (a) showed no CPE.

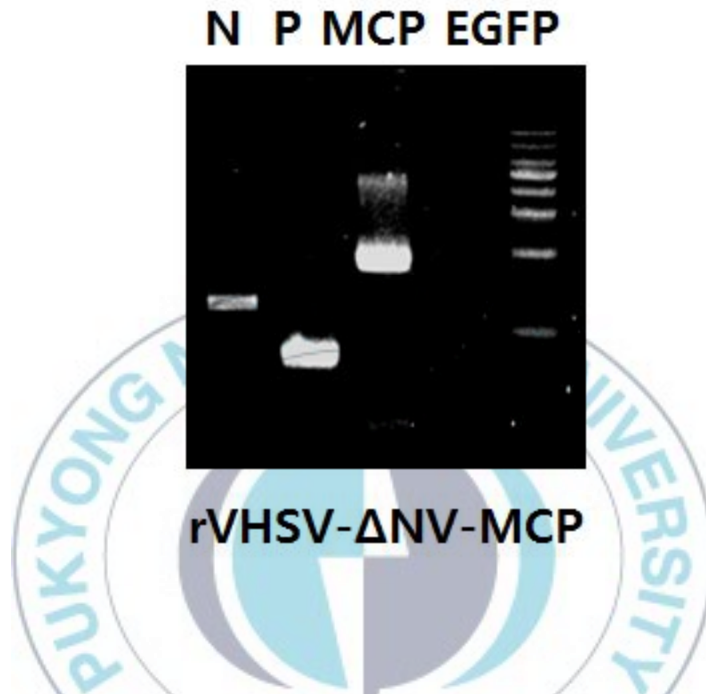


Figure 5. Confirmation of the rescue of recombinant virus by RT-PCR. Viral genomic RNA extracted from stock supernatant of rVHSV-ΔNV-MCP was amplified by RT-PCR with specific nucleoprotein (N), phosphoprotein (P), LCDV MCP (MCP) and enhanced green fluorescence protein (EGFP) primers. PCR products were analyzed on a 1% agarose gel, and visualized with ethidium bromide (EtBr). In the rVHSV-ΔNV-MCP, the EGFP gene was not amplified, whereas the MCP gene was exactly amplified. The marker (M) is a 1kb DNA ladder (Bioneer, Korea).



Figure 6. Plaque formation in *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) cells infected with 10^{-5} - 10^{-8} diluted wild-type VHSV and rVHSV- Δ NV-MCP. Cells were cultured under 0.7% agarose-containing plaquing medium, fixed at 7 days post-infection, and stained with crystal violet.

2. 재조합 VHSV의 replication 확인

Wild-type VHSV와 rVHSV- Δ NV-MCP의 replication을 plaque assay를 통한 바이러스 성장곡선을 이용하여 비교해 보았다. 두 바이러스의 성장 곡선을 비교해 본 결과, rVHSV- Δ NV-MCP가 wild-type VHSV보다 replication 속도가 느린 것을 확인할 수 있었다(Fig. 7).

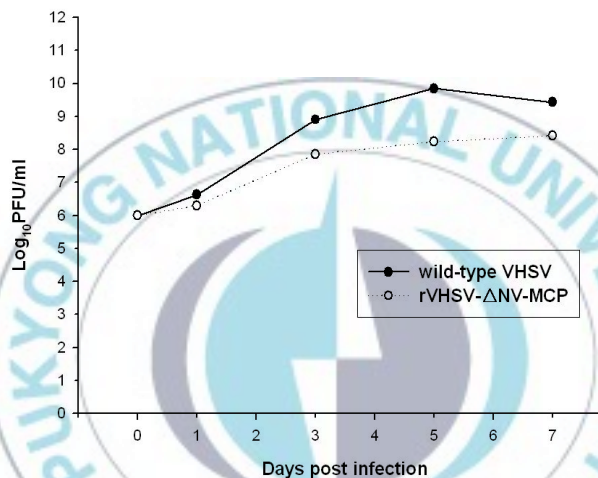


Figure 7. Growth curves of wild-type VHSV and rVHSV- Δ NV-MCP. *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) cells were infected with (a) MOI 1.0 or (b) MOI 0.00001 of each virus, and the replication of viruses was analyzed by plaque assay after 1, 3, 5, 7 d post-inoculation.

3. 세포별 재조합 VHSV 감염성 비교 확인

세포에 따라 재조합 VHSV의 감염성이 어떻게 다른지 확인하기 위해서 EPC, HINAE, CHSE-214 cell에 각각 wild-type VHSV와 재조합 바이러스인 rVHSV- Δ NV-MCP를 MOI 0.1, 0.001, 0.00001로 접종하여 7일 후, CPE가 나타나는 양상을 비교해 보았다. 그 결과 EPC 세포에서는 wild-type VHSV와 rVHSV- Δ NV-MCP를 MOI 0.1과 0.001로 접종한 세포에서 전체적으로 광범위한 CPE가 나타나는 것을

확인하였다. wild-type VHSV를 0.00001로 접종한 EPC 세포는 약간의 CPE가 나타난 것을 확인할 수 있었지만 rVHSV- Δ NV-MCP를 0.00001로 접종한 EPC 세포에서는 확실한 CPE를 관찰 할 수 없었다(Fig. 8a). HINAE 세포에서는 EPC 세포보다 약하긴 하지만 이와 비슷하게 wild-type VHSV와 rVHSV- Δ NV-MCP를 MOI 0.1과 0.001로 접종한 세포에서 CPE가 나타난 것을 확인할 수 있었다. 하지만 MOI 0.00001로 접종한 세포에서는 CPE를 전혀 관찰 할 수 없었다(Fig. 8b). CHSE-214 세포에서는 wild-type VHSV를 접종한 세포와 rVHSV- Δ NV-MCP를 접종한 세포 모두에서 세포가 약간씩 뜰 것을 확인할 수 있었지만 확실한 CPE는 관찰 할 수 없었다(Fig. 8c). 또한 같은 MOI로 접종한 wild-type VHSV와 재조합 VHSV를 비교한 결과, wild-type VHSV가 재조합 VHSV보다 CPE가 더 많이 나타나는 것을 알 수 있었다.



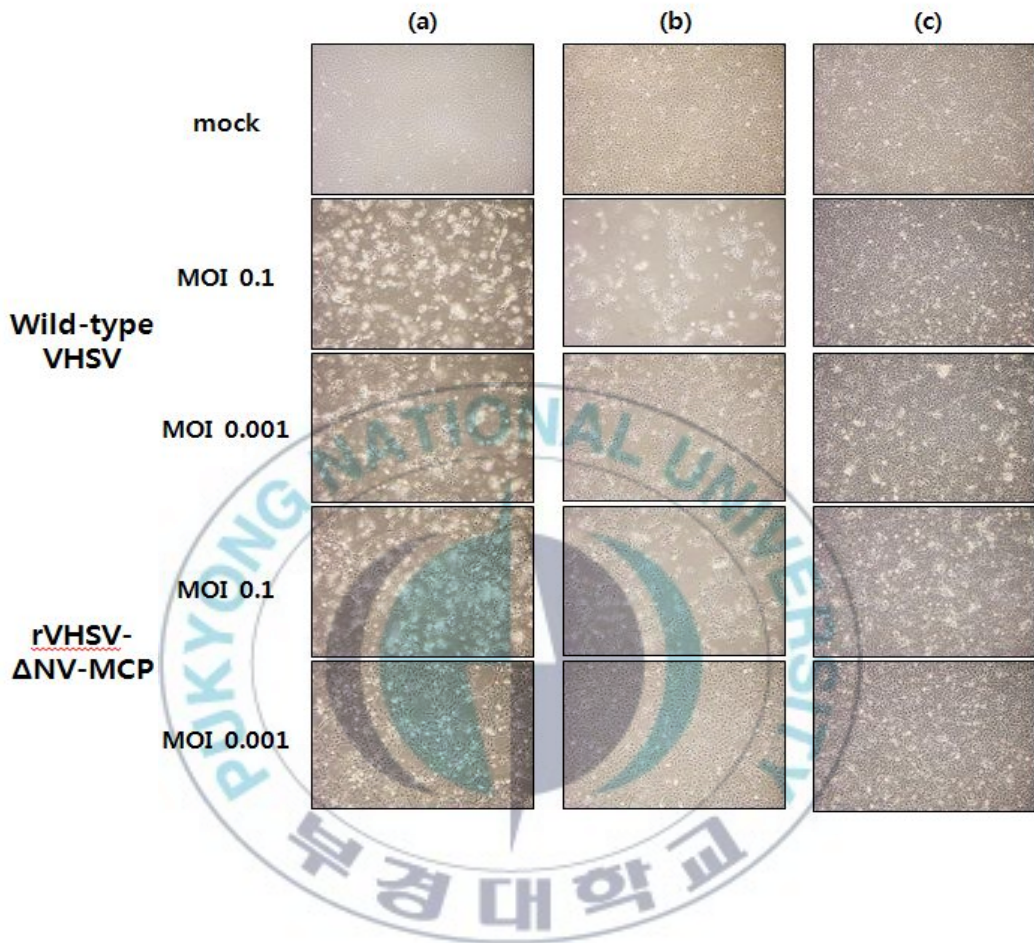


Figure 8. The cytopathic effect (CPE) induced by infection of (a) *Epithelioma papulosum cyprinid* (EPC) cells, (b) *Hirame natural embryo* (HINAE) cells or (c) *Chinook salmon embryonic* (CHSE-214) cells with wild-type VHSV or rVHSV-ΔNV-MCP at various MOI after 7 days post-infection.

4. In vitro, In vivo 상에서 Mx 유전자 발현 확인

4-1. Luciferase reporter system을 이용한 Mx 유전자 발현 확인

Luciferase reporter vector를 삽입한 EPC 세포에 wild-type VHSV와 rVHSV- Δ NV-MCP를 접종하였다. 12시간 쯤 luciferase 활성을 측정한 결과 control 세포와 비교하여 큰 차이는 없었다(Fig. 9a). 24시간 쯤 luciferase 활성을 측정한 결과 rVHSV- Δ NV-MCP를 MOI 1.0으로 접종한 세포에서 luciferase 활성이 가장 높은 것을 확인할 수 있었으며, rVHSV- Δ NV-MCP를 MOI 0.1로 접종한 세포가 두번째로 활성이 높은 것을 확인할 수 있었다(Fig. 9b). wild-type VHSV를 MOI 1.0과 0.1로 접종한 세포는 약하긴 하지만 control 세포에 비해 luciferase 활성이 높은 것을 확인하였다. 48시간째에 측정한 결과 rVHSV- Δ NV-MCP를 MOI 1.0으로 접종한 세포에서 luciferase 활성이 가장 높았으며(Fig. 9c), 24시간째와 비슷한 양상을 보였다. EPC 세포에서 luciferase 활성은 12시간째에는 별 변화가 없었지만, 24시간부터 시작하여 48시간까지 계속적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 9d).

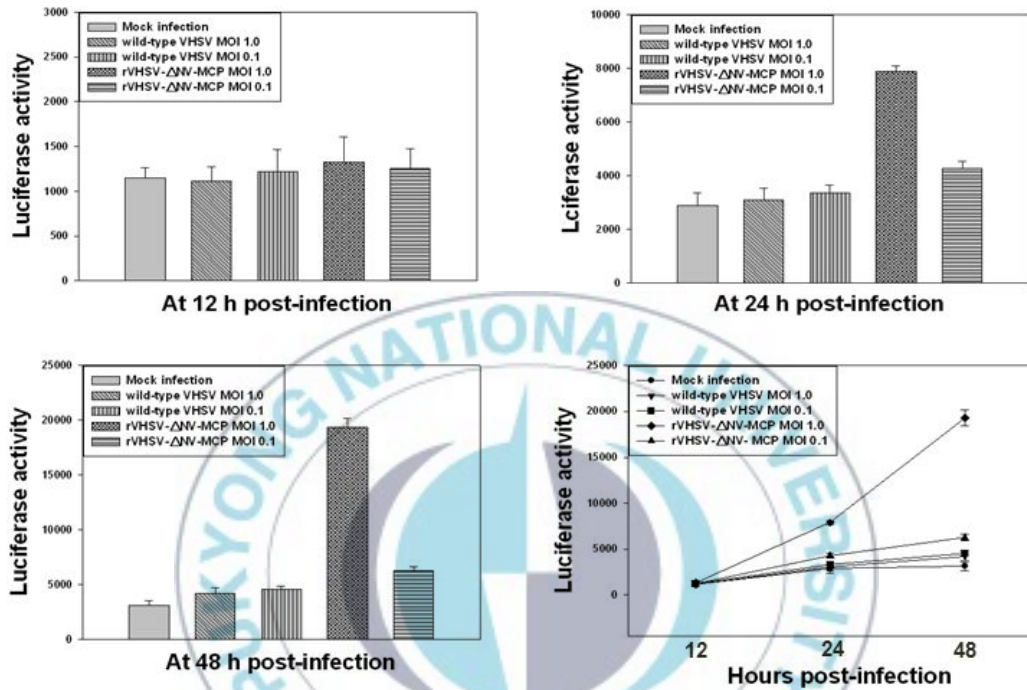


Figure 9. Analysis of Mx1 gene expression in *Epithelioma papulosum cyprinid* (EPC) cells by measuring activity of luciferase that was used as the reporter protein. EPC cells were infected with wild-type VHSV or rVHSV-ΔNV-MCP at MOI 1.0 and 0.1, and luciferase activity was analyzed at (a) 12h, (b) 24h, and (c) 48h post-infection. (d) time-course change of luciferase activity.

4-2. In vivo상에서 Mx 유전자 발현 확인

재조합 VHSV를 녀치에 근육 주사했을 때 IFN- I 반응에 어떤 영향을 미치는 지 알아보기 위해서 L-15 배지와 wild-type VHSV, rVHSV- Δ NV-MCP를 접종 후, 24 시간과 48시간째에 녀치의 장기별 Mx 유전자 발현을 확인하였다. 24시간째 rVHSV- Δ NV-MCP를 주사한 그룹에서 wild-type VHSV를 주사한 그룹보다 더 많은 Mx 유전자가 발현하는 것을 확인할 수 있었다. 48시간째에는 wild-type VHSV를 주사한 그룹과 rVHSV- Δ NV-MCP를 주사한 그룹 모두에서 Mx 유전자가 많이 발현 하는 것을 확인할 수 있었다. 신장과 비장에서 24시간째나 48시간째 Mx 유전자의 발현 양상은 전체적으로 비슷하게 나타났다(Fig. 10).



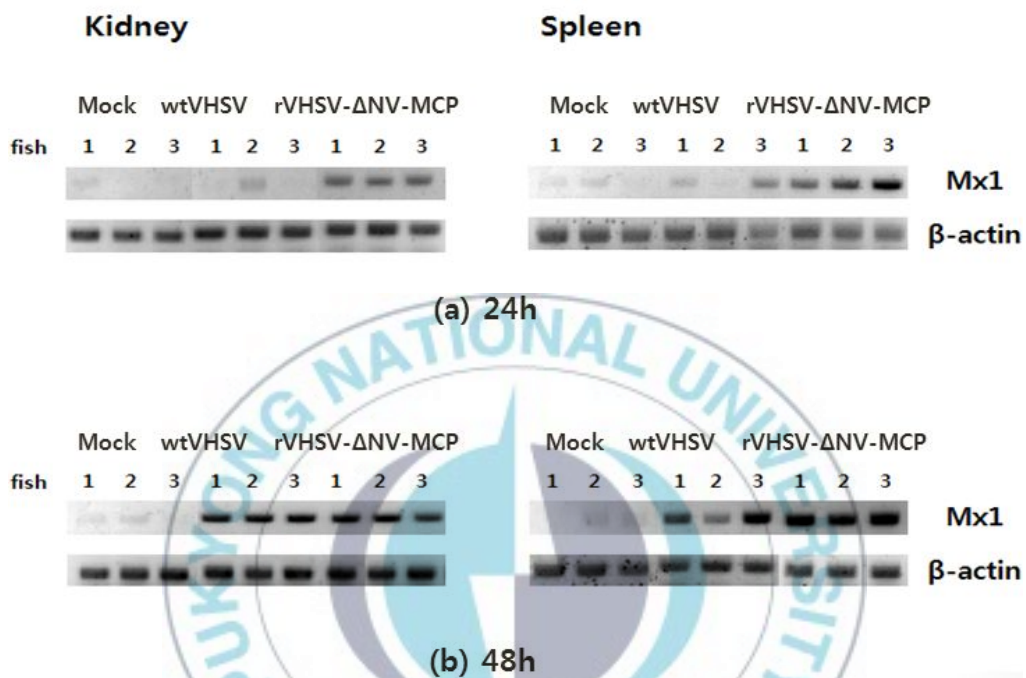


Figure 10. Analysis of Mx gene expression in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) by semi-quantitative RT-PCR. Olive flounder fingerlings were injected with wild-type VHSV and rVHSV-ΔNV-MCP at a dose of 10^5 PFU per fish, and expression of Mx gene to OF β -actin gene in the spleen and the kidney was analyzed at (a) 24 h and (b) 48 h post-infection.

IV. 고 찰

Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV)와 lymphocystis disease virus (LCDV)는 양식 넙치에서 생산성과 상품성에 큰 피해를 주는 바이러스이다. VHSV는 넙치의 치어뿐만 아니라 성어에서도 대량폐사를 야기하는 바이러스이며(Schlotfeldt & Ahne, 1988; Schlotfeldt et al. 1991; Mortensen et al., 1999; Isshiki et al., 2003; Skall et al., 2005), LCDV는 가시적인 결절성 병변으로 인해 상품가치의 하락을 야기하는 바이러스이다(Iwamoto et al., 2002). 하지만 아직 이러한 바이러스 질병에 대한 효과적인 대책은 없는 실정이다. 최근 reverse genetics system을 이용한 안전하고 새로운 바이러스 백신이 연구 되고 있다. 이 시스템은 바이러스의 full genome과 상보적인 cDNA를 이용하여 세포에서 바이러스를 다시 생성해 내는 것이다. 이러한 기술을 이용하여 바이러스의 특정 유전자를 knock-out 시키거나 mutation 하여 약독화 재조합 바이러스를 제작할 수 있으며, 이렇게 제작된 약독화 재조합 바이러스는 높은 면역원성으로 세포성 면역뿐만 아니라 체액성 면역도 효과적으로 유도할 수 있어 생백신으로 사용이 가능하고, 자연적인 감염경로로 백신을 투여할 수 있다는 장점이 있다(Schnell et al., 1994; Palese et al., 1996; Neumann & Kawaoka, 2001; Neumann et al., 2002; von Messling & Cattaneo, 2004).

어류에서 reverse genetics system을 이용하여 재조합 VHSV, SHRV, IHNV를 제작하고 이를 백신으로 사용하기 위한 연구 논문들이 발표되어 있다(Johnson et al., 2000; Alonso et al., 2004; Biacchesi et al., 2000, 2002, 2010; Ammayappan et al., 2010a,b). 최근 본 연구실에서는 reverse genetics system을 기본으로 하는 T7 RNAP 발현 시스템을 이용하여 VHSV의 NV 유전자가 knock-out된 재조합 VHSV를 제작하여 그 특성과 백신으로서의 효과를 확인한 바 있다(Kim et al., 2011; Kim & kim, 2011). 본 실험에서는 이렇게 제작된 재조합 VHSV를 이용하여 LCDV의 MCP 유전자를 발현하는 VHSV를 제작하였다. VHSV의 NV 유전자 대신 EGFP 유전자가 들어있는 pVHSV- Δ NV-EGFP 벡터에서 제한효소를 이용하여 EGFP 유전자를 제거하고, LCDV의 바이러스 단백질인 MCP (major capsid protein) 유전자를 삽입하여 pVHSV- Δ NV-MCP 벡터를 제작하였다. 이렇게 제작한 벡터를 supporting 벡터와 함께 T7 RNA polymerase (T7 RNAP)를 발현하는 EPC 세포에 co-transfection 하여 재조합 바이러스인 rVHSV- Δ NV-MCP를 제작하였다. RT-PCR를 실시하여 전기영동 한 결과, VHSV-N, VHSV-P 유전자와 LCDV-MCP 유전자는 증폭 된 것을 확인할 수 있었지만 EGFP 유전자는 증폭되지 않아 목적인 데

로 LCDV의 MCP가 발현되는 재조합 VHSV가 제작되었음을 알 수 있었다. 제작된 재조합 바이러스는 plaque assay를 통해 감염성 있는 바이러스임을 확인하였다.

바이러스는 숙주 특이성으로 인해 세포의 종류에 따라 감염성이 달라지게 된다. VHSV는 EPC와 GF에서 특히 감수성이 높은 것으로 알려져 있으며, CHSE-214 세포에서는 감수성이 낮은 것으로 알려져 있다(Lorenzen et al., 1999). 본 실험에서는 HINAE 세포와 EPC 세포, CHSE-214 세포에 제작된 재조합 VHSV와 wild-type VHSV를 MOI를 달리하여 접종한 후, 세포에 따라 감염성이 달라지는 지 비교해 보았다. 그 실험 결과, wild-type VHSV와 재조합 VHSV 모두 EPC 세포에서 가장 감수성이 높은 것을 확인할 수 있었다. 그리고 EPC 세포에 비해 늦게 CPE가 나타나긴 하지만 HINAE 세포도 감수성이 높은 것을 확인할 수 있었다. 하지만 CHSE-214 세포에는 감수성이 높지 않으며, 높은 농도로 접종하여야 CPE를 확인할 수 있었다. 이는 세포의 종류에 따라 바이러스의 감수성이 다르기 때문이라 생각되며, CHSE-214 세포보다 EPC 세포에서 감수성이 더 높다는 선행 연구와 같은 결과를 나타냈다(Lorenzen et al., 1999). 앞선 세포별 바이러스 감염성 확인 실험에서 같은 MOI로 접종하였을 때, 재조합 VHSV가 wild-type VHSV보다 CPE가 적게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 이는 두 바이러스의 replication 속도 차이 때문이라 생각되며 성장곡선을 제작하여 비교한 결과, 본 실험에서 제작된 재조합 바이러스인 rVHSV- Δ NV-MCP가 wild-type VHSV보다 성장속도가 느린 것을 확인할 수 있었다. 이는 제거된 NV 유전자가 바이러스의 replication에 영향을 주기 때문이라 생각되며, 이러한 실험결과는 NV 유전자가 knock-out된 재조합 VHSV와 wild-type VHSV의 성장 곡선을 비교한 선행 연구 결과와 같은 결과를 나타내었다(Kim et al., 2011; Kim & kim, 2011).

Type I interferon 반응은 바이러스에 감염되었을 때 숙주에서 가장 먼저 나타나는 반응이다. Mx 단백질은 척추동물에서 interferon 반응을 유도하는 대표적인 항바이러스 단백질이다(Haller & Kochs, 2002; Haller et al., 2007). 어류에서 Mx 단백질의 항바이러스 반응은 대서양 연어에서 Mx1 단백질이 IPNV의 복제를 억제한다는 연구(larwen et al., 2004)와 넙치에서 Mx 단백질이 HIRRV와 VHSV의 복제를 억제한다는 연구(Caipang et al., 2003)를 통해 밝혀져 있다. 본 연구에서는 재조합 VHSV인 rVHSV- Δ NV-MCP에 의한 인터페론 유도를 알아보기 위하여 in vitro 상에서는 luciferase reporter system을 이용하여, in vivo 상에서는 semi-

quantitative RT-PCR을 이용하여 Mx 유전자의 발현량을 비교하였다. 그 결과, luciferase 활성 측정과 semi-quantitative RT-PCR 모두 재조합 VHSV를 접종한 실험구에서 wild-type VHSV를 접종한 실험구보다 Mx 유전자의 발현이 많이 되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 바이러스 감염초기에는 NV 유전자로 인해 인터페론 반응이 억제되다가 감염후기에는 인터페론 반응이 다시 돌아오기 때문이라 생각되며, 이는 선행 연구된 NV 유전자가 knock-out 된 재조합 VHSV의 실험과 비슷한 결과를 나타냈다(Kim & kim, 2012).

결론적으로 본 실험에서는 VHSV와 LCDV에 대한 복합백신으로 사용하기 위해 LCDV의 MCP 유전자를 발현하는 재조합 VHSV를 제작하였으며, 그 특성을 분석하였다. 제작된 재조합 VHSV는 wild-type VHSV와 비교하여 성장속도가 느린 것을 확인하였고, plaque assay를 통해 감염성이 있는 바이러스임을 확인하였다. 넓치에 재조합 VHSV를 근육주사 하였을 때 폐사가 전혀 나타나지 않는 것을 확인하였으며, wild-type VHSV보다 바이러스 감염초기 인터페론 반응이 더 많이 유도되는 것을 확인하였다. 이는 재조합 VHSV의 선행 연구들과 비슷한 결과를 나타내었으며, 이로 인해 제작된 재조합 바이러스가 약독화 된 것을 확인 할 수 있었다. 이 연구결과는 본 실험에서 제작된 재조합 VHSV (rVHSV- Δ NV-MCP)를 넓치에 복합백신으로 적용하기 위한 기초 실험으로 앞으로 이를 적용하기 위한 in vivo 연구에 이용될 것이라 생각된다.

V. 요 약

넙치 양식에서 VHSV와 LCDV는 생산성과 상품성에 큰 피해를 주는 바이러스이다. VHSV는 저수온기에 넙치의 대량 폐사를 야기하고, LCDV는 가시적인 결절성 병변으로 인해 상품성을 하락시킨다. 하지만 아직 이러한 바이러스성 질병을 예방하기 위한 효과적인 대책은 없는 실정이다. 최근 reverse genetics system을 이용하여 재조합 바이러스를 제작하는 기술이 연구되고 있다. 이 기술로 인해 바이러스의 유전자 기능 및 작동 기작을 분석하는 것이 가능하게 되었고, 바이러스의 특정 유전자를 knock-out 시키거나 mutation 하여 약독화된 재조합 생백신을 제작할 수 있게 되었다. 이렇게 생산된 재조합 약독화 바이러스 백신은 높은 면역원성으로 인해 세포성 면역뿐만 아니라 체액성 면역까지 높은 면역반응을 유도할 수 있고, 자연적인 감염경로를 통해 백신이 투여될 수 있다는 장점이 있다. 최근 본 연구실에서는 NV 유전자가 knock-out된 재조합 VHSV를 제작하였고 이를 넙치에 면역화 실험 한 결과, VHSV에 대한 높은 면역반응을 검증하였다. 본 논문에서는 이러한 재조합 VHSV를 이용하여 LCDV도 예방할 수 있는 복합백신을 제작하였다. VHSV의 NV 유전자를 knock-out 시키고, 그 자리에 LCDV의 MCP 유전자를 삽입하여 재조합 VHSV 발현 벡터를 제작하였다. 이렇게 제작된 벡터를 VHSV의 N, P, L 유전자를 발현하는 supporting 벡터와 함께 T7 RNA polymerase가 발현되고 있는 세포에 co-transfection 하여 LCDV의 MCP 유전자를 발현하는 재조합 VHSV를 제작하였다. RT-PCR을 실시한 결과 LCDV의 MCP가 발현되고 있는 VHSV가 제작되었음을 확인하였고, plaque assay를 실시하여 감염성 있는 바이러스라는 것을 확인하였다. 세포에 따른 재조합 바이러스의 감염성을 확인한 결과 EPC세포와 HINAE세포에서는 높은 감수성을 나타냈지만 CHSE-214세포에서는 낮은 감수성을 나타내는 것을 확인하였다. 성장곡선을 통한 replication 비교 결과, 선행 연구와 같이 wild-type VHSV에 비해 rVHSV- Δ NV-MCP의 성장이 더 느린

것을 확인 할 수 있었다. Luciferase reporter system과 semi-quantitative RT-PCR 을 통한 Mx 유전자의 발현량을 비교해 본 결과, 재조합 바이러스가 감염 초기에 더 많은 인터페론 반응을 유도하였으며, 이는 선행된 연구결과에 따라 VHSV의 NV 유전자에 의해 감염초기 인터페론 반응이 억제되기 때문이라 생각된다. 본 연구를 통해 제작된 rVHSV- Δ NV-MCP는 그 특성을 연구한 본 연구결과 약독화 생백신으로 사용 될 수 있는 특성을 제시했으며, 후에 LCDV와 VHSV에 대한 복합 백신으로 적용하기 위한 in vivo 연구에 적용 될 것이라 생각된다.



Ⅵ. 감사의 글

좀 더 공부하고 싶다는 막연한 생각과 욕심으로 시작한 석사과정을 이 논문으로 마무리하게 되었습니다. 2년 반이란 긴 시간 동안 생각지도 못한 벽에 부딪혀 힘들기도 했지만 많은 분들의 관심과 격려와 애정으로 그 시간들을 견뎌내고 이렇게 잘 끝맺음 하게 되었습니다. 제게 관심과 격려로 힘을 주신 많은 분들께 이

지면을 빌어 감사의 말씀을 전하고자 합니다. 먼저 언제나 한결 같은 모습으로 부족한 저를 많은 관심과 격려로 이끌어주신 존경하는 김기홍 지도교수님께 감사의 말씀을 드립니다. 교수님의 은혜를 잊지 않는 제자가 되도록 하겠습니다. 바쁘신 와중에도 논문 심사를 위해 시간 내어주신 정현도 교수님과 정준기 교수님께도 감사 드리며, 마주칠 때 마다 웃으며 격려해 주신 박수일 교수님과 허민도 교수님, 강주찬 교수님께도 감사 드립니다. 부족한 저를 앞에서 끌어주고 뒤에서 밀어준 실험실원들에게도 감사의 마음을 전합니다. 매니저를 자청하며 힘들 때마다 옆에서 가장 많은 힘이 되어준 예재선배, 이런저런 질문에도 항상 웃으며 답해주고 조언 해준 민선언니, 항상 티격태격하지만 다정한 승혁선배에게 감사하다는 말을 전하고 싶습니다. 학부동기이자 대학원동기로 힘들 때마다 서로 의지하고 걱정해준 병철이, 처음 대학원 생활 1년동안 옆에서 많은 이야길 나누며 의지했던 우리, 내내 실험실에서 막내로 고생만 하다가 대한이, 지금은 다른 공부에 매진하고 있는 능글맞은 일호, 맘도 여리고 장난기도 많은 경수에게도 고맙다는 말과 항상 응원한다는 말을 전하고 싶습니다. 혼자 석사과정 하면서 앞으로 힘든 일 많을 병우, 항상 밝은 모습으로 힘을 주던 지선이, 무엇이든 열심히 하는 귀여운 막내 수진이에게도 고맙다는 말을 전하고 싶습니다. 필요한 것이 있으면 항상 챙겨줬던 은혜언니를 비롯한 실험실 선배님들과 후배님들께도 감사하다는 말을 전하고 싶습니다. 자주 보지는 못하지만 항상 아낌없는 격려와 사랑을 준 내 가장 소중한 친구들 미선이, 상호, 정온이에게 고맙다는 말과 사랑한다는 말을 전하고 싶고, 힘든 박사과정을 하고 있는 은비와 실없는 농담으로 간간이 웃음을 준 남씨에게도 고맙다는 말을 하고 싶습니다. 항상 격려해 준 궁합이 잘 맞는 영원한 룸메이트 효진언니, 일본에서 공부하느라 바쁜 와중에도 응원해 준 수진언니, 강산이 변한다는 10년동안 한결 같은 베프 정애와 혜정이에게도 고맙다는 말을 전하고 싶습니다. 그리고 먼 곳에서 일하느라 바쁜 와중에도 아낌없는 관심과 격려를 해준 성용오라버니께 고맙다는 마음을 전하고 싶습니다. 마지막으로 항상 부족한 큰딸을 걱정하면서도 잘 할 수 있게 사랑과 격려로 믿고 지지해준 사랑하고 존경하는 부모님과 모자란 언니 때문에 힘들어 하면서도 항상 응원해준 미안하고 사랑하는 보경이, 무뎌보이지만 가끔은 따스하게 힘을 준 사랑하는 정현이에게 미안하고 고맙고 사랑한다는 마음을 전하고 싶습니다. 이 좁은 지면에 고마운 많은 분들을 열거하면서 감사의 마음을 전하기에는 부족하지만 항상 제게 힘이 되어준 많은 분들을 생각하며 내일을 더 열심히 살기 위해 노력하며 은혜에

보답하겠습니다.

VII. 참고문헌

Ammayappan A., LaPatra S.E., and Vakharia V.N., (2010a). A vaccinia virus-free reverse genetics system for infectious hematopoietic necrosis virus. J Virol Methods., 167, 132-139

H B Jang, Y R Kim, I S Cha, S W Noh, S B Park, M Ohtani, J Hikima, T Aoki and T S Jung., (2011). Detection of antigenic proteins expressed by lymphocystis virus as vaccine candidates in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel). Journal of Fish Diseases., 34, 555-562

Ammayappan A., Kurath G., Thompson T.M., and Vakharia V.N., (2010b). A reverse genetics system for the Great Lakes strain of viral hemorrhagic septicemia virus: the NV gene is required for pathogenicity. Mar Biotechnol.. DOI 10.1007/s10126-010-9329-4.

Biacchesi S., Thoulouze M.I., Béarzotti M., Yu Y.X., and Brémont M., (2000). Recovery of NV knockout infectious hematopoietic necrosis virus expressing foreign genes. J Virol., 74, 11247-11253.

Biacchesi S., Lamoureux A., Mérour E., Bernard J., and Brémont M., (2010). Limited interference at the early stage of the infection between two recombinant *Novirhabdovirus*: the viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) and the infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). *J Virol.*, 84, 10038–10050.

Biacchesi S., Béarzotti M., Bouguyon E., and Brémont M., (2002). Heterologous exchanges of the glycoprotein and the matrix protein in a *Novirhabdovirus*. *J Virol.*, 79, 2881–2889.

Biacchesi S., Thoulouze M.L., Béarzotti M., Yu Y.X., and Brémont M., (2000). Recovery of NV knockout infectious hematopoietic necrosis virus expressing foreign genes. *J Virol.*, 74, 11247–11253.

Min Sun Kim, Ki Hong Kim., (2012) Effects of NV gene knock-out recombinant viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) on Mx gene expression in *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) cells and olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish & shellfish immunology.*, 32, 459–463.

Biacchesi S., Béarzotti M., Bouguyon E., and Brémont M., (2002). Heterologous exchanges of the glycoprotein and the matrix protein in a *Novirhabdovirus*. *J Virol.* 76, 2881–2889.

Zheng F.R., Sun X.Q., Liu H.Z. & Zhang J.X. (2006) Study on the distribution and expression of a DNA vaccine against lymphocystis disease virus in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture.*, 261, 1128–1134.

Buchholz U.J., Finke S., and Conzelmann K.K., (1999). Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter. *J Virol.* 73, 251–259.

Iwamoto R., Hasegawa O., LaPatra S. & Yoshimizu M. (2002) Isolation and characterization of the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) lymphocystis disease virus. *Journal of Aquatic Animal Health* 14, 114-123.

Burke J.A., and Mulcahy D., (1980). Plaquing procedure for infectious hematopoietic necrosis virus. *Appl Environ Microbiol.*, 39, 872-876.

Caipang C.M., Hirono I., and Aoki T., (2003). In vitro inhibition of fish rhabdoviruses by Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* Mx. *Virology.*, 317, 373-382.

Estepa A., Fernandez-Alonso M., and Coll J.M., (1999). Structure, binding and neutralization of VHSV with synthetic peptides. *Virus Res.*, 63, 27-34.

Fijan N., Sulimanovic D., Bearzotti M., Mizinic D., Zwillenberg L.O., Chilmonczyk S., Vautherot J.F., and de Kinkelin P., (1983). Some properties of the *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) cell line from carp *Cyprinus carpio*. *Ann. Virol.*, 134, 207-220.

Paul Schnitzler and Gholamreza Darai., (1993). Identification of the gene encoding the major capsid protein of fish lymphocystis disease virus. *Journal of General Virology.*, 74, 2143-2150

Johnson M.C., Simon B.E., Kim C.H., and Leong J.C., (2000). Production of recombinant snakehead rhabdovirus: the NV protein is not required for viral replication. *J Virol.*, 74, 2343-2350.

Finke S., and Conzelmann K.K., (2005). Recombinant rhabdoviruses: vectors for vaccine development and gene therapy. *Curr Top Microbiol Immunol.*, 292, 165-200.

Gomez-Casado E., Estepa A., and Coll J.M., (2011), A comparative review on

European-farmed finfish RNA viruses and their vaccines. *Vaccine.*, 29, 2657-2671.

Haller O., and Kochs G., (2002). Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic.*, 3, 710-717.

Haller O., Stertz S., and Kochs G., (2007). The Mx GTPase family of interferon-induced antiviral proteins. *Microbes Infect.*, 9, 1636-1643.

Kim M.S., and Kim K.H., (2011). Protection of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, against viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) by immunization with NV gene-knockout recombinant VHSV. *Aquaculture.*, 314, 39-43.

Larsen R., Røkenes T.P., and Robertsen B., (2004). Inhibition of infectious pancreatic necrosis virus replication by atlantic salmon Mx1 protein. *J Virol.*, 78, 7938-7944.

Feng Rong Zheng, XiuQin Sun, Ming Qing Xing & Hongzhan Liu., (2010). Immune response of DNA vaccine against lymphocystis disease virus and expression analysis of immune-related genes after vaccination. *Aquaculture Research*, 41, 1444-1451.

Lenoir G., and de Kinkelin P., (1975). Fish rhabdoviruses: comparative study of protein structure. *J Virol.* 16, 259-262.

Lecocq-Xhonneux F., Thiry M., Dheur I., Rossius M., Vanderheijden N., Martial J., and de Kinkelin P., (1994). A recombinant viral haemorrhagic septicaemia virus glycoprotein expressed in insect cells induces protective immunity in rainbow trout. *J Gen Virol.*, 75, 1579-1587.

Levy D. E., and García-Sastre A., (2001). The virus battles: IFN induction of the antiviral state and mechanisms of viral evasion. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 12, 143-156.

Lorenzen N., Olesen N.J., Jorgensen P.E.V., Etzerodt M., Holtet T.L., and Thogersen

H.C., (1993)., Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of the glycoprotein gene of VHS virus, and immunization of rainbow trout with the recombinant protein. J Gen Virol., 74, 623-630.

Neumann G., Whitt M.A., and Kawaoka Y., (2002). A decade after the generation of a negative-sense RNA virus from cloned cDNA - what have we learned? J Gen Virol., 83, 2635-2662.

Neumann G., and Kawaoka Y., (2004). Reverse genetics systems for the generation of segmented negative-sense RNA viruses entirely from cloned cDNA. Curr Top Microbiol Immunol., 283, 43-60.

Ooi E.L., Hirono I., and Aoki T., (2006). Functional characterisation of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, Mx promoter. Fish Shellfish Immunol., 21, 293-304.

Patton J.T., Davis N.L., and Wertz G.W., (1984). N protein alone satisfies the requirement for protein synthesis during RNA replication of vesicular stomatitis virus. J Virol., 49, 303-309.

Romero A., Figueras A., Thoulouze M.I., Bremont M., and Novoa B., (2008). Recombinant infectious hematopoietic necrosis viruses induce protection for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Dis. Aquat. Org., 80, 123-135.

Schnell M.J., Mebastsion T., and Conzelmann K.K., (1994). Infectious rabies viruses from cloned cDNA. EMBO J., 13, 4195-4203.

Schütze H., Enzmann P.J., Mundt E., and Mettenleiter T.C., (1996). Identification of the non-virion (NV) protein of fish rhabdoviruses viral haemorrhagic septicaemia virus and infectious haematopoietic necrosis virus. J Gen Virol., 77, 1259-1263.

Snow M., Cunningham C.O., Melvin W.T., and Kurath G., (1999). Analysis of the nucleoprotein gene identifies distinct lineages of viral haemorrhagic septicaemia virus

within the European marine environment. *Virus Res.*, 63, 35-44.

Thoulouze M.I., Bouguyon E., Carpentier C., and Bremont M., (2004). Essential role of the NV protein of Novirhabdovirus for pathogenicity in rainbow trout. *J Virol.*, 78, 4098-4107.

Wolf K (ed), (1988). Viral hemorrhagic septicaemia. In: *Fish viruses and fish viral diseases*. Cornell University Press, New York., p 217-249.

